

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS Y DESCRIPCIÓN DE LOS TIPOS DE DEPÓSITOS EN LENTES DE CONTACTO EN UNA POBLACIÓN UNIVERSITARIA

Autor/es

Diana Martínez Armengot

Director/es

Sofía Otín Mallada
Eugenio Vispe Palacín

Facultad de Ciencias, Grado de Óptica y Optometría
Curso 2018-2019

ÍNDICE

1.	Justificación del tema	3
2.	Introducción	4
2.1.	Lente de contacto.....	4
2.1.1.	Lentes de contacto blandas.....	4
2.2.	Depósitos presentes en las lentes de contacto.....	4
2.3.	Métodos para detectar depósitos en lentes de contacto	5
2.4.	Lentes de contacto y la población universitaria.....	7
3.	Hipótesis	8
4.	Objetivos.....	8
5.	Metodología	9
5.1.	Diseño del estudio y selección de la muestra	9
5.1.1.	Diseño del estudio	9
5.1.2.	Selección de las muestras	9
5.2.	Caracterización de las muestras y creación de la base de datos	10
5.3.	Procesamiento de las muestras	10
5.3.1.	Conservación de las lentes de contacto.....	10
5.3.2.	Preparación de las muestras	11
5.3.3.	Preparación de los reactivos fosfovainilina y Bradford.....	11
5.4.	Método analítico	12
5.4.1.	Análisis de las muestras	12
5.5.	Curva de calibrado.....	12
5.6.	Obtención de los resultados	13
5.6.1.	Cálculo de la masa.....	13
5.6.2.	Análisis estadístico	13
6.	Resultados	14
6.1.	Estadística descriptiva	14
6.2.	Estadística analítica	15
7.	Discusión.....	16
8.	Conclusiones.....	22
9.	Abreviaturas	23
10.	Bibliografía.....	24
11.	Anexos	26

1. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Las lentes de contacto (LCs) sirven, principalmente, para compensar un defecto refractivo. Ofrecen algunas mejoras respecto a las gafas como puede ser el aumento del campo visual, mayor comodidad, estética o efecto terapéutico. Estas podrían ser algunas de las razones por las que en los últimos años se adaptan más LCs.

Dentro de la población universitaria, pocos conocen la existencia de la adherencia de lípidos y proteínas sobre la superficie de la lente de contacto (LC), que pueden provocar sequedad ocular e infecciones. Estos aparecen debido a los hábitos de higiene del usuario, características de la LC, tipo de solución de limpieza y la composición de la lágrima. ⁽¹⁾

Cuanta más información se tenga sobre la cantidad de depósitos que puede haber en la superficie de una LC, mejor se puede informar sobre los problemas asociados a un mal uso, además de dar una buena orientación en cuanto al tipo de material y solución de limpieza; con todo esto se puede ofrecer una mejor orientación optométrica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LENTE DE CONTACTO

Las LCs son elementos ópticos que se colocan sobre la superficie ocular y sirven para mejorar la visión. ⁽²⁾ Según el material con el que se fabriquen pueden ser LCs rígidas permeables a los gases (LCRGP) o lentes de contacto blandas (LCB). ⁽²⁾⁽³⁾

2.1.1. LENTES DE CONTACTO BLANDAS

La LCB presenta un alto contenido en agua, permeabilidad al oxígeno y están fabricadas con materiales que le confieren flexibilidad. Todas estas características causan que las LCB se ajusten a la forma del ojo y, por tanto, tengan una rápida adaptación. ⁽⁴⁾

Dependiendo del material con el que se fabriquen, las LCB se pueden clasificar en:

- **Hidrogel silicona (HS).** Este tipo de LCs son las más populares, son cómodas, flexibles, elásticas y con gran permeabilidad al oxígeno. Se originan a partir de cadenas poliméricas, con enlaces de oxígeno y silicio, los cuales incorporan radicales hidrófobos. ⁽²⁾⁽⁴⁾
- **Hidrogel (HG).** Estas LCs tienen un alto contenido en agua, lo que le confiere una elevada permeabilidad al oxígeno. ⁽⁴⁾ Están formados por enlaces de carbono a carbono (relativamente rígidos), con otros tipos de radicales. Compuestos por una fase polimérica y una acuosa, que determina la transmisión de oxígeno. ⁽²⁾⁽³⁾

Según la Food and Drug Administration (FDA) las LCs se dividen en cuatro grupos:

El **grupo I** y el **grupo II**, corresponden a LCs no iónicas con medio y alto contenido en agua, respectivamente. Estos tipos de LCs repelen las sustancias con carga iónica (calcio y algunas proteínas) presentes en la película lagrimal. ⁽³⁾⁽⁵⁾

El **grupo III** y **grupo IV** se tratan de LCs iónicas con medio y alto contenido en agua, respectivamente. A diferencia de los dos grupos anteriores, estos dos atraen las sustancias con carga iónica (calcio y algunas proteínas) presentes en la película lagrimal. ⁽³⁾⁽⁵⁾

2.2. DEPÓSITOS PRESENTES EN LAS LENTES DE CONTACTO

Cuando se coloca una LC sobre la superficie ocular, se crea una pequeña capa de lágrima sobre la LC. Esta fina capa de película lagrimal se reorganiza y reestablece mediante el parpadeo, pero si la superficie es hidrofóbica esta acción se ve dificultada.

Las LCs son membranas semipermeables que interactúan con la película lagrimal, produciendo que exista una adherencia de sustancias sobre su superficie, las más comunes son los lípidos, proteínas, mucinas y otros componentes inorgánicos. ⁽¹⁾⁽⁶⁾ La película lagrimal es una mezcla de proteínas, lípidos y electrolitos en agua. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

La cantidad de depósitos y su aparición depende de la carga de la superficie del material, contenido en agua, el porcentaje de hidrofilia, tiempo de uso, las características la película lagrimal, solución de limpieza y hábitos de higiene. ⁽⁹⁾

En una LC los depósitos que se pueden adherir a su superficie son principalmente los lípidos y las proteínas. Estos provocan incomodidad, reducción de la visión, irritación ocular y riesgo de infecciones. ⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾

- **Lípidos.** Son uno de los principales componentes de la película lagrimal, y su composición tiene una gran influencia sobre la estabilidad de la lágrima, pudiendo provocar ojo seco y el éxito de la adaptación de la LC.

Se han identificado varios tipos de lípidos en la película lagrimal. ⁽¹¹⁾ Son producidos por las glándulas de meibomio, y secretadas a través del borde palpebral libre, dividiéndose estos en lípidos polares y no polares.

En las LCs, el lípido que se encuentra en mayor cantidad es el colesterol, aunque también pueden aparecer ésteres de cera, esteroides grasos, alcoholes grasos, ácidos grasos y diglicéridos. ⁽⁶⁾

- **Proteínas.** Son polímeros de aminoácidos, los cuales están compuestos por grupos amino y carboxilo, unidos para formar cadenas peptídicas. Cada cadena peptídica tiene una determinada disposición de los aminoácidos en su estructura, este cambio en la secuencia produce cambios en sus propiedades. ⁽¹²⁾

Existen más de 400 proteínas diferentes en la película lagrimal. ⁽¹³⁾ De todas estas, las que se encuentran con más frecuencia en las LCs son la lipocalina, lisozima, lactoferrina, lacritina, inmunoglobulina A (IgA) y proteína 4 enriquecida en prolina. ⁽⁶⁾

Las LCs iónicas con alto contenido en agua atraen mayor contenido de proteínas procedentes de la película lagrimal, debido a la atracción electrostática entre la proteína y el material. ⁽¹³⁾

2.3. MÉTODOS PARA DETECTAR DEPÓSITOS EN LENTES DE CONTACTO

LÁMPARA DE HENDIDURA

La biomicroscopia o lámpara de hendidura se usa para observar la cara anterior de la LC cuando está colocada sobre la superficie del ojo.

Se trata de un método subjetivo en el que se pueden observar los depósitos de lípidos que existen sobre la superficie de la LC. Para poder visualizarlos se usan diferentes niveles de magnificación e iluminación del tipo reflexión especular. ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

CROMATOGRAFÍA

- **Cromatografía de líquidos de alto rendimiento**

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) permite separar mezclas complejas en función de la polaridad. Para ello se usa una fase estacionaria (sólido) que contiene partículas muy finas que se empaquetan en una columna, y una fase móvil (disolvente líquido). ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

La muestra a estudiar se inyecta en la columna y se eluye con la fase móvil. Cada uno de los componentes de esta muestra presentara diferente afinidad por la fase estacionaria, haciendo que permanezcan más o menos tiempo en el instrumento. Un detector situado al final de la columna es el que se encarga de estudiar estos componentes. ⁽¹⁷⁾

- **Cromatografía de capa fina**

La cromatografía de capa fina (CCF), consta de una fase móvil (líquido) y una estacionaria (sólido), siendo esta última el material absorbente. ⁽¹⁸⁾ En la una placa de vidrio o plástico, recubierta con material absorbente (fase estacionaria), se coloca la mezcla a estudiar. El extremo de la placa se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, y el disolvente irá ascendiendo por la placa arrastrando los diferentes componentes. ⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

- **Cromatografía de gases**

En la cromatografía de gases (CG), la fase estacionaria se encuentra en una columna y la fase móvil es un gas que fluye por esta columna. ⁽¹⁵⁾ El analito se introduce a través de un septum en la zona de inyección, en la que se formará un gas. El gas es arrastrado hacia la columna cromatográfica, en la que interactúa con la fase estacionaria hasta su salida. Un detector analiza este gas generado para averiguar la concentración de la muestra estudiada. ⁽¹⁷⁾⁽²¹⁾

ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría permite determinar la concentración química a partir de la interacción de la luz con la materia. ⁽²²⁾

Cuando un haz de luz, que presenta una determinada intensidad (I_0), atraviesa una disolución de contenido absorbente, su intensidad disminuye hasta un valor I_t : ⁽¹⁵⁾⁽²²⁾

$$I_0 = I_a + I_t \quad (22)$$

Siendo I_0 la intensidad inicial, I_t la intensidad final e I_a la intensidad absorbida.

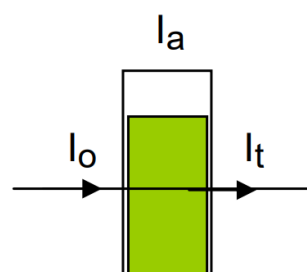


Figura 1. Comportamiento del haz de luz sobre una muestra.

En una disolución, cuando incide un haz de luz con una determinada longitud de onda (λ), una parte de luz es absorbida por la disolución y la restante la atraviesa, en función de su transmitancia. Existe una relación entre la absorbancia (A) y la transmitancia (T), ya que cuanto mayor es la luz absorbida por la disolución, mayor será su A y menor la T de la disolución. ⁽²³⁾

$$T = I_s / I_0 \quad (23) \quad A = -\log T \quad (23)$$

Siendo I_s la intensidad de luz transmitida e I_0 la intensidad de luz incidente.

La ley de Beer-Lambert relaciona la absorbancia con la concentración del absorbente y el trayecto del haz de luz: ⁽¹⁷⁾⁽²³⁾

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon \quad (23)$$

Siendo A la absorbancia; ϵ el coeficiente de absortividad molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); l la longitud del recipiente (cm); c la concentración (mol/litro).

- **Espectrofotometría UV-Visible**

En la espectrofotometría UV-Visible se irradia luz, con una λ entre 195 nm y 780 nm, a una muestra para conocer cuál es la cantidad de luz que absorbe. A partir de estos valores se obtiene un espectro, en el que se representa gráficamente la intensidad de luz absorbida en función de la λ . ⁽²⁴⁾

A este instrumento se le denomina espectrofotómetro. Está compuesto por varias fuentes de luz (como las lámparas de wolframio y lámparas de deuterio), un sistema de colimación, un sistema monocromador (prisma o espejo) para dividir la radiación, un sistema de dispersión para variar el ancho de banda, un detector que recibe la luz transmitida para transformarla en energía eléctrica, el cual es detectado por el registrador y un recipiente donde se coloca la muestra a estudiar. ⁽²⁵⁾

2.4. LENTES DE CONTACTO Y LA POBLACIÓN UNIVERSITARIA

En los últimos años, ha habido un gran avance en cuanto a la fabricación de las LCs, ya que se usan múltiples materiales para su fabricación. Esto provoca que exista una gran variedad de LCs, permitiendo que la mayoría de los individuos puedan usarlas. ⁽¹⁾

Al existir esta variedad en cuanto al tipo de material, muchos usuarios con defectos refractivos prefieren usar LC a gafa, ya sea por motivos terapéuticos, estéticos, mayor comodidad o mejora de la visión.

Tanto la población del ámbito universitario como el resto de población, prefiere usar LCB. En estas el tiempo de adaptación es mucho menor que en las de tipo LCRGP y se pueden usar de forma esporádica, siendo el reemplazo más popular el mensual seguido de las desechables diarias. El tipo de solución de limpieza más usado es la solución única.

En el caso de los españoles y de otros países de Europa, Asia y América, la LC más popular sigue siendo la LCB con un alto contenido en agua, de reemplazo mensual o diario y con diseño esférico. Como sistema de limpieza el más común es la solución única. ⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾

Un estudio realizado por la *American Optometric Association (AOA)* demostró que una gran parte de los usuarios de LCs desconocen o bien se desentienden de los problemas provocados por un mal uso de las LCs. ⁽²⁹⁾

Uno de los principales problemas es que las usan más tiempo de lo recomendado, ya sea en las horas diarias como en el reemplazo. Este suceso está favorecido porque las LCs no son productos sanitarios económicos, y esto provoca que muchos de ellos prefieran usarlas más tiempo de lo recomendado a dejar de usarlas. Otros de los malos hábitos más comunes son que no se lavan las manos cuando las manipulan, no se las quitan cuando están en contacto con el agua y no se le da el uso correcto a la solución de limpieza.

Por tanto, una gran parte de la población que usa LCs les da un mal uso, siendo conocedores o no de las posibles consecuencias; ya que consideran que realizar este tipo de actividades es algo normal y no les va a ocurrir nada por hacerlo. ⁽²⁶⁾⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

3. HIPÓTESIS

La espectrofotometría UV-Visible es un método que permite detectar y cuantificar depósitos de tipo lipídico y de tipo proteico presentes en LCs usadas.

4. OBJETIVOS

- I. Determinación de depósitos lipídicos y proteicos mediante la espectrofotometría UV-Visible.
- II. Estudiar la concentración promedio detectada de depósitos de tipo lipídico presentes en LCs utilizadas por usuarios en una población universitaria.
- III. Estudiar la concentración promedio detectada de depósitos de tipo proteico presentes en LCs utilizadas por usuarios en una población universitaria.

5. METODOLOGÍA

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

5.1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un método de detección de depósitos de lípidos y proteínas presentes en las LCs usadas basado en la técnica de espectrofotometría UV-Visible. Con esto se pretendía detectar y analizar los depósitos de carácter lipídico y proteico presentes en las LCs utilizadas por la población del entorno universitario y estudiar una posible relación con los hábitos de uso.

Este estudio observacional y longitudinal, se diseñó dentro de un estudio experimental realizado en el laboratorio de cromatografía y espectroscopia del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza.

5.1.2. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las LCs utilizadas para este estudio fueron dadas por sujetos sanos y que fuesen ya usuarios de LCs, la mayoría de ellas procedían de amigos y compañeros de universidad. Dependiendo del hábito de uso que habían seguido, las LCs se dividieron de dos grupos:

- **LCs de uso “controlado”.** Procedentes de usuarios de LCs dispuestos a seguir unas pautas de uso y mantenimiento, y a los que posteriormente se les hizo entrega de las LCs (más información en el anexo 1). Las pautas de uso que debían seguir estos usuarios fueron de: 1 día, 7 días, 7 días frotando la LC con solución única para su limpieza, 15 días y 15 días frotando. En el análisis estadístico de este estudio sólo se incluyeron las LCs de 15 días sin frotar.
- **LCs de uso “no controlado”.** Procedentes de LCs de sujetos voluntarios que habían sido donadas después del uso habitual, sin seguir ningún procedimiento predefinido de manipulación. Para ello se organizaron una serie de eventos en la Universidad de Zaragoza (cartel del evento en el anexo 2), donde se invitaba a los alumnos y profesores a donar sus LCs usadas.

Para conocer las características de esas LCs, que sensaciones tenían los usuarios y sus hábitos de uso, los participantes cumplimentaron un breve cuestionario (anexo 3).

Independientemente del tipo de donante, cada LC debía cumplir unos criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión fueron:

1. El material de la LC debía ser de tipo HG o HS, todas tenían que ser de tipo blando.
2. Utilizadas un mínimo de 8 horas seguidas o al menos un día de uso.
3. Presentar una compensación óptica superior a cero, independientemente del error refractivo.
4. Suministrar la LC en un recipiente estanco y cubierta con la solución de mantenimiento habitual (en el caso de las LCs de uso no controlado).

Los criterios de exclusión fueron:

1. LCs que hubiesen sufrido alguna alteración del protocolo de uso, en el caso de los voluntarios de tipo controlado.

2. LCs de tipo cosmético o terapéutico.
3. LCs de sujetos que hubiesen padecido algún tipo de proceso patológico ocular durante el estudio o en los últimos 3 meses previos al mismo, y/o LCs de sujetos con síntomas de un proceso catarral o alérgico activo.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS

Para poder identificar cada una de las muestras se definió un código alfanumérico, según las iniciales del nombre y apellidos del voluntario, la edad y la pauta de uso.

Ejemplo: DMA23OI6

- DMA: iniciales del nombre y los apellidos.
- 23: edad.
- OI, OD: ojo izquierdo u ojo derecho.
- 1, 2, 3, 4, 5: pautas de uso controlado. (anexo 1)
- 6: uso no controlado para análisis de lípidos.
- 7: uso no controlado para análisis de proteínas.

Con todos los datos recogidos se diseñó una tabla de Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, Seattle, EEUU), en la que a cada uno de los bloques le correspondía una variable:

1. Código identificativo de la muestra.
2. Edad.
3. Sexo.
4. Concentración de proteínas.
5. Concentración de lípidos.
6. Material de la LC (HG o HS).
7. Tipo de reemplazo.
8. Refracción.
9. Geometría (tipo de compensación óptica).
10. Sistema de mantenimiento usado.
11. Tipo de pauta de uso.
12. Días de uso.
13. Horas de uso.
14. Respuestas dicotómicas del cuestionario: comodidad, calidad visual, uso de lágrimas artificiales, presencia de irritación ocular, sensación de sequedad ocular y molestia con la LC puesta.
15. Hábito alimenticio.

5.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

5.3.1. CONSERVACIÓN DE LAS LENTES DE CONTACTO

Las LCs de uso controlado fueron conservadas en viales con una solución de cloroformo:metanol y almacenadas en congelador. Una vez hubieran finalizado todas las pautas de uso, los usuarios hicieron llegar las LCs congeladas y se depositaron inmediatamente en el congelador del laboratorio. Las LCs recogidas durante los eventos en la Universidad de Zaragoza fueron introducidas y conservadas aleatoriamente en viales con cloroformo:metanol o suero fisiológico (SF) conforme eran donadas por los participantes. Todos los viales fueron

rotulados con un código identificativo que relacionaba la muestra con el cuestionario que habían cumplimentado y fueron inmediatamente almacenadas en el congelador del laboratorio.

Los viales que contenían SF tenían como finalidad la de conservar las proteínas presentes en las LCs, mientras que los viales con cloroformo:metanol tenían como propósito extraer los lípidos presentes en las LCs.

Para más información sobre los materiales y reactivos utilizados consultar los anexos 4 y 5.

5.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparación de las muestras para el análisis de lípidos

Los viales que contenían la LC en cloroformo:metanol se extrajeron del congelador y se agitaron con el vórtex para que toda la LC estuviera en contacto con el cloroformo:metanol. Pasadas 2 horas se les extrajo la LC con unas pinzas. Los viales se almacenaron en una gradilla.

A cada vial se le añadió 200 µL de agua MILLI Q, mediante una micropipeta. Con el vórtex se mezclaron todos los elementos y se dejaron reposar durante 24 horas, con el objetivo de que la muestra se separara en dos fases. Se podía apreciar una fase superior (fase acuosa) compuesta por agua y metanol, y otra inferior (fase orgánica) formada por cloroformo:metanol y los lípidos, siendo esta última la que interesaba.

Cuando las dos fases ya estaban perfectamente separadas, se extrajo la fase que contenía los lípidos. Esta se quitó con una jeringuilla y se puso en otro vial, el cual estaba etiquetado de la misma forma que el original. Cada vial se puso en la desecadora termostática al vacío, durante 24 horas, para que en cada uno de ellos solo quedaran los lípidos procedentes de la LC.

Preparación de las muestras para el análisis de proteínas

Los viales que contenían la LC en SF, se sacaron del congelador y se almacenaron en una gradilla a temperatura ambiente hasta que se descongelaran.

Para eliminar el exceso de SF de los viales se usó la desecadora termostática al vacío junto con pentaóxido de fósforo, para que en cada vial solo quedara la LC con el depósito proteico.

Cuando las muestras ya estaban secas, se les añadió 250 µL de agua MILLI Q con 0,2% de volumen de ácido trifluoroacético y 250 µL de acetonitrilo de calidad HPLC. Todo esto se mezcló con el vórtex y se dejó reposar 24 horas, con el objetivo de extraer las proteínas de las LCs.

5.3.3. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS FOSFOVAINILLINA Y BRADFORD

Los reactivos fosfovainillina y Bradford permitieron averiguar la cantidad de lípidos y proteínas, respectivamente. Los productos resultantes de la reacción de la fosfovainillina con los lípidos y el reactivo de Bradford con las proteínas originaron derivados coloreados que pudieron ser medidos mediante la espectrofotometría UV-Visible.

Descripción del procedimiento de obtención de estos reactivos en el anexo 6.

5.4. MÉTODO ANALÍTICO

5.4.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

La espectrofotometría UV-Visible se utilizó como método de análisis para estudiar los lípidos y proteínas presentes en las LCs. A este instrumento se le denomina espectrofotómetro de absorción, el cual utiliza la luz correspondiente al rango del espectro visible y ultravioleta (UV) para medir la absorción de una determinada sustancia; con este se registraron los espectros de cada LC.

Se usaron dos cubetas de cuarzo, en una de ellas se puso la muestra que se deseaba analizar, y en la otra la que se usaba como blanco de referencia.

Para evitar errores de medida por contaminación con la muestra anterior, se limpió la cubeta de la muestra que se estaba midiendo con agua y acetona. Cuando se media una LC, la cubeta se limpiada y se pasaba a medir la siguiente, y así sucesivamente.

Análisis de los lípidos

A los viales que estaban sin disolvente, con una micropipeta se les añadió 50 µL de agua MILLI Q y 100 µL de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se agitaron manualmente y se calentaron en un baño de agua a 90° durante 30 minutos, agitando las muestras manualmente cada 5 minutos.

En un nuevo vial se preparó el reactivo usado como blanco de referencia (50 µL de agua MILLI Q, 100 µL de ácido sulfúrico y 150 µL de reactivo de fosfovainillina).

Los viales se sacaron del baño de agua y se dejaron enfriar antes de añadir 150 µL de reactivo de fosfovainillina. Todos los viales, incluido el blanco de referencia, se calentaron a 40° durante 15 minutos. Pasado este tiempo a todos ellos se les añadió 150 µL de agua MILLI Q.

Posteriormente serían analizadas por la espectrofotometría UV-Visible. La medida se realizó a la λ de 523 nm, ya que es donde se aprecian los productos de la reacción entre los lípidos y la fosfovainillina.

Análisis de las proteínas

En un vial se puso 1 ml del reactivo de Bradford diluido y 50 µl del líquido de extracción de la LC que se quería analizar (250 µL de agua MILLI Q con 0,2% de volumen de ácido trifluoroacético y 250 µL de acetonitrilo de calidad HPLC). Antes de ser medida mediante la espectrofotometría UV-Visible, cada vial se mezclaba bien y se dejaba reposar durante un minuto.

En la espectrofotometría UV-Visible las proteínas se apreciaron a la λ de 575 nm, ya que es donde se apreciaba los productos de la reacción entre el reactivo de Bradford diluido (blanco de referencia) y las proteínas.

5.5. CURVA DE CALIBRADO

La curva de calibrado es un método en el que se determina la relación existente entre una señal analítica y la concentración; por tanto, cuando se desea saber cuál es la concentración de una muestra a partir de la absorbancia es necesario realizar una curva de calibrado.

Los espectros se obtuvieron a partir de una concentración conocida, medida mediante la espectrofotometría UV-Visible. Con la medida de esta señal se obtiene una gráfica, donde “y” es la absorbancia y “x” la masa, ajustando todos los valores se obtiene una fórmula del tipo: $y = mx + b$. Esto sirvió para poder calcular la cantidad en masa del analito en cada una de las muestras.

Descripción del proceso de obtención de la curva de calibrado de los lípidos y proteínas en el anexo 7.

5.6. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

5.6.1. CÁLCULO DE LA MASA

Cuando ya se habían medido todas las muestras, los espectros de absorción se guardaron en el ordenador. De cada uno de ellos se obtuvo la línea base para conocer cuál era el valor 0 de absorción, y de esta forma se podía conocer el valor de la absorbancia en la λ en la que se apreciaban los lípidos y las proteínas.

Despejando el valor x de las ecuaciones obtenidas por la curva de calibrado se calculó cual era la cantidad (mg) de analito:

$$\text{Masa de lípidos (mg/LC)} = (0,4197 - \lambda_{523}) / 3,2427$$

Siendo λ_{523} la absorbancia en la λ de 523nm; 0,4197 y 3,2427 los valores obtenidos en la curva de calibrado.

$$\text{Masa de proteínas (mg/LC)} = (0,0007 + \lambda_{575}) / 0,868$$

Siendo λ_{575} la absorbancia en la λ de 575nm; 0,0007 y 0,868 los valores obtenidos de la curva de calibrado.

Estas dos fórmulas se introdujeron en una hoja de cálculo Excel, en las que se tuvo que introducir el valor de la absorción de cada uno de los espectros. Con esto se calculó el valor de la masa de lípidos y proteínas, los cuales se copiaron a la base de datos del estudio.

5.6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (Versión 19.0; IBM, Somers NY) tras importar la base de datos creada en un archivo Excel al mismo.

Estadística Descriptiva. Esta describía las características de las muestras y usuarios incluidas en el estudio y los parámetros obtenidos en el análisis de las mismas. Se utilizaron la media y la desviación estándar en el caso de variables cuantitativas y frecuencias y/o porcentajes en el caso de variables cualitativas.

Estadística Analítica. Se aplicó el test de Kolmogórov-Smirnov para comprobar que los datos de las muestras siguieran una distribución normal. Mediante el test de la T de Student se compararon los valores medios y las diferencias que podrían existir entre estas, y el test de las correlaciones de Pearson para saber si existía alguna relación entre dos variables y en su caso la cantidad de esta relación.

6. RESULTADOS

6.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se recogieron un total de 279 LCs. 23 LCs fueron excluidas del estudio por presentar algún criterio de exclusión o no cumplir los criterios de inclusión. Se eliminaron las LCs de usos 1, 2, 3 y 4 (anexo 1) correspondientes a los usuarios controlados por no ser necesarias en esta parte del estudio. Finalmente 143 LCs fueron incluidas en el análisis estadístico.

La edad media de los usuarios que donaron sus LCs fue de $24,80 \pm 7,94$ años. Estas habían sido usadas durante $9,54 \pm 3,23$ horas al día y $17,75 \pm 13,33$ días.

El porcentaje de usuarios varones que donaron sus LCs fue menor que las mujeres, 16,8% y 83,2%, respectivamente.

La mayoría de las LCs fueron de HS, 128 LCs; mientras que 15 LCs fueron de HG. Entre las LCs recogidas el material más utilizado fue Comfilcon A. Otros materiales recogidos fueron: Lotrafilcon B y Fanfilcon A.

El 100% de los usuarios usaban solución única (S.U.) como sistema de limpieza, aunque la composición química de éstas era diferente. La más utilizada era la de la farmacéutica Avizor (34% de los usuarios), seguida de la S.U. Biotrue y Disop, (12,3% de los usuarios en ambas). En el anexo 8 se explica la composición química de las S.U.

El tipo de reemplazo más utilizado por los usuarios que donaron sus LCs fue el mensual, 103 LCs, seguido de las desechables diarias, 36 LCs. Únicamente 4 LCs correspondían al régimen de reemplazo quincenal.

El 46% de las LCs recogidas eran de geometría esférica, 57 LCs para la compensación de la miopía y 10 LCs para compensar la hipermetropía. Un 23,8% presentaban geometría cilíndrica, siendo 25 LCs una combinación de miopía y astigmatismo, y 9 LCs una combinación de hipermetropía y astigmatismo. El 30,2% restante era desconocido para los usuarios.

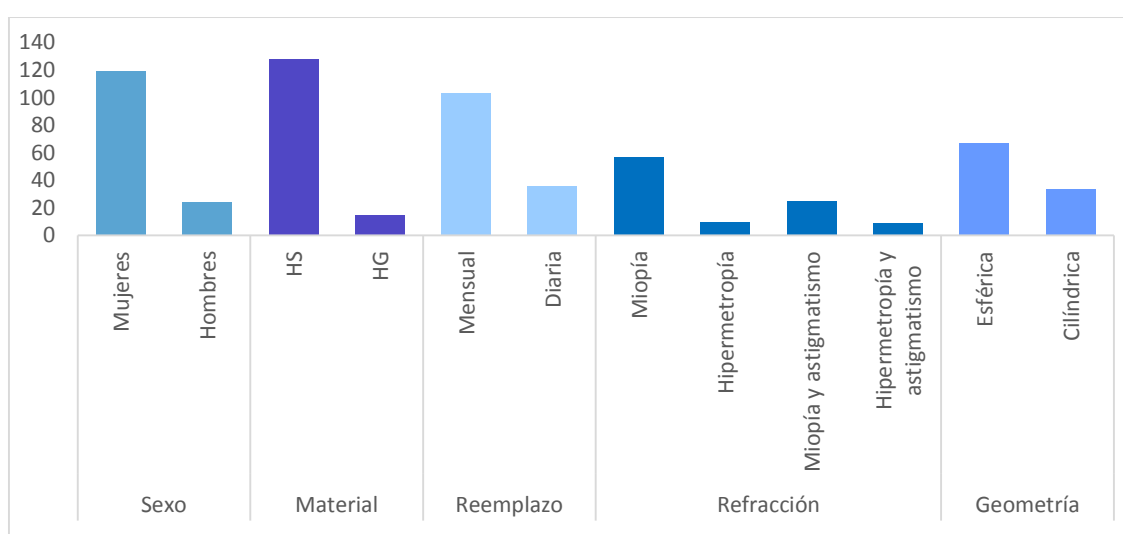


Figura 2. Frecuencia de las LCs incluidas en el análisis estadístico según el sexo, material reemplazo, refracción y geometría.

6.2. ESTADISTICA ANALÍTICA

Tabla con las cantidades de lípidos y proteínas en el anexo 9.

DEPÓSITOS LIPÍDICOS

De las 143 LCs recogidas, 86 LCs fueron destinadas al análisis de lípidos. La concentración promedio de lípidos detectada fue de $0,241 \pm 0,191$ mg/LC.

- **Según material**

La masa promedio de lípidos detectada en las LCs de HS y HG fue de $0,229 \pm 0,198$ mg/LC y $0,299 \pm 0,147$ mg/LC, respectivamente. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el material.

- **Según el sexo**

La cantidad de lípidos presentes en las LCs fue mayor en las mujeres que en los hombres, con $0,25 \pm 0,19$ mg/LC y $0,202 \pm 0,196$ mg/LC, respectivamente. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el sexo.

- **Según el reemplazo**

La concentración promedio de lípidos detectada fue muy semejante en ambos tipos de reemplazo, siendo un poco mayor en las LCs de desecho mensual, con un valor de $0,237 \pm 0,211$ mg/LC, respecto LCs de desecho diario de $0,247 \pm 0,134$ mg/LC. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el reemplazo.

- **Según geometría**

La masa de lípidos detectada en las LCs esféricas fue de $0,262 \pm 0,274$ mg/LC, y en las LCs cilíndricas de $0,192 \pm 0,165$ mg/LC. No se evidenciaron diferencia estadísticamente significativa entre las masas y la geometría de la LCs.

DEPÓSITOS PROTEICOS

De las 143 LCs, 57 LCs fueron destinadas al análisis de proteínas. La concentración promedio detectada de proteínas fue de $0,098 \pm 0,111$ mg/LC.

- **Según material**

La masa promedio detectada de proteínas en las LCs de HS fue de $0,091 \pm 0,014$ mg/LC, mientras que en las de HG fue de $0,309 \pm 0,107$ mg/LC. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el material.

- **Según sexo**

La cantidad de proteínas detectada en las muestras fue mayor en mujeres que en los hombres, $0,106 \pm 0,116$ mg/LC y $0,052 \pm 0,05$ mg/LC, respectivamente. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el sexo.

- **Según el reemplazo**

En LCs de desecho mensual se detectó una masa de proteínas de $0,09 \pm 0,112$ mg/LC y en LCs de desecho diario de $0,13 \pm 0,109$ mg/LC. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las masas detectadas según el reemplazo.

- **Según la geometría**

La cantidad de proteínas detectada fue de $0,107 \pm 0,108$ mg/LC en las LCs de geometría esférica, y de $0,043 \pm 0,074$ mg/LC en las de geometría cilíndrica. No se evidenciaron diferencia estadísticamente significativa entre las masas y la geometría de la LCs.

CORRELACIÓN SEGÚN LAS HORAS DE USO, DÍAS DE USO Y LA EDAD

No se apreció relación significativa entre las horas de uso y la concentración de proteínas y/o la concentración de lípidos. Tampoco se apreció relación entre los días de uso y la concentración de lípidos o proteínas. No se evidenciaron relaciones entre la edad y las concentraciones de lípidos o proteínas detectadas.

	MASA DE PROTEÍNAS		MASA DE LÍPIDOS	
	P	C. PEARSON	P	C. PEARSON
HORAS DE USO	0,607	-0,070	0,915	0,012
DÍAS DE USO	0,668	-0,058	0,893	0,016
EDAD	0,054	-0,262	0,388	0,099

Tabla 1. Correlación de Pearson (C. Pearson) y significancia ($p < 0,05$) entre las cantidades de lípidos y proteínas, con las horas de uso, días de uso y la edad.

7. DISCUSIÓN

COMENTARIOS GENERALES

El objetivo de este trabajo fue crear un estudio sobre el uso de las LCs en la Universidad de Zaragoza. Se quería conocer datos sobre las rutinas de uso, materiales más utilizados, cantidad de depósitos de tipo lipídico y proteico que presentaban, y conocer si existía una relación de estos resultados con las características de las LCs.

Para realizar el análisis de la masa de lípidos y proteínas fue necesario desarrollar un método de marcaje y detección de sustancias en laboratorio, para las medidas se utilizó la técnica de espectrofotometría UV-Visible.

COMENTARIOS SOBRE LA METODOLOGÍA

En este estudio se quiso analizar la cantidad de lípidos y proteínas en las LCs usadas por un grupo de población de la Universidad de Zaragoza.

Para la realización de este estudio se necesitaron un gran número de LCs, por ello se decidió usar LCB, ya que se trata del tipo de LC más usado actualmente. ⁽²⁶⁾ Además de eso, uno de los requisitos era que en esta debían ser usadas durante un determinado tiempo para poder estudiar los lípidos y proteínas presentes en su superficie.

Para conseguir las LCs se plantearon dos métodos. Por un lado, las LCs de usuarios a los que se les dio unas pautas de uso (anexo 1), y que fueron denominadas LCs de uso controlado; y por otro lado las LCs obtenidas en los eventos realizados en la Universidad de Zaragoza, se las denominó LCs de uso no controlado. Las LCs correspondientes de uso controlado procedían de

personas conocidas, usuarios previos de LCs, que se ofrecieron a colaborar en este estudio. Las correspondientes a las de uso no controlado procedían de usuarios de LCs aleatorios que donaron sus LCs en los eventos realizados en la Universidad de Zaragoza. *Saville et al.* y *Hatou et al.* realizaron sus estudios únicamente usuarios de tipo controlado a los que se les dio unas determinadas pautas de uso. ⁽³¹⁾⁽³²⁾ A diferencia de estos autores, en este estudio también se incluyeron usuarios de tipo no controlado.

Se plantearon estos dos métodos ya que se participó en un estudio de mayor magnitud en el que participaron varios estudiantes y se necesitaba un gran número de LCs, aunque en el trabajo expuesto no fue necesario incluir todas las LCs recogidas.

Para disponer de la información sobre los hábitos del usuario y las características de las LCs se creó un breve cuestionario que rellenaron todos los donantes de manera anónima y que iba asociado a cada una de las muestras (anexo 3). *Saville et al.* y *Hatou et al.* realizaron sus estudios con usuarios controlados y no fue necesario realizar ningún tipo de cuestionario al terminar con el estudio. ⁽³¹⁾⁽³²⁾ En este estudio se podría haber realizado un procedimiento semejante al de estos autores, seleccionando un número menor de muestras o el mismo que el estudiado, pero con un seguimiento de todas ellas.

Los donantes de uso controlado, cuando terminaban una pauta de uso, depositaban la LC en un vial con cloroformo:metanol y etiquetado con la pauta de uso correspondiente; *Saville et al.* y *Hatou et al.* también utilizaron cloroformo:metanol como método de conservación de los lípidos en LCs usadas. ⁽³¹⁾⁽³²⁾ Los donantes de uso no controlado hicieron llegar sus LCs en el porta lentes con la S.U. que usaban habitualmente, estas se introdujeron de forma aleatoria en viales de SF o cloroformo:metanol; *Castillo et al.* y *Bohnert et al.* utilizaron un método de conservación distinto, ya que disolvieron varias proteínas en solución salina. ⁽³³⁾

En el estudio se establecieron criterios de inclusión y exclusión, por los que cada LC se debía adaptar a estas condiciones para poder ser incluida en el análisis estadístico.

Para poder ser incluida en este estudio, la LC debía haber sido usada un mínimo de 8 horas. Se estableció este mínimo de 8 horas ya que en ese tiempo ya podían existir depósitos sobre la LC, *Hatou et al.* estableció un mínimo de 12 horas. ⁽³²⁾

Algunas de las LCs fueron excluidas del estudio debido a que el usuario presentaba algún signo de alergia, irritación u otra patología ocular. En el estudio de *Hatou et al.* todos sus usuarios controlados eran asintomáticos. ⁽³²⁾ Tampoco se incluyeron LCs que eran enjuagadas con soluciones de limpieza tipo peróxido. En este caso se eliminaron 2 LCs por usar este tipo de sistema de limpieza, el resto de los donantes usaba S.U. como método de limpieza.

Para conservar y extraer los lípidos de las LCs se usó cloroformo:metanol. *Hatou et al.* y *Saville et al.* observaron que el cloroformo:metanol es un buen medio para estudiar los depósitos lipídicos presentes en las LCs, ya que el cloroformo permite separar los lípidos y el metanol actúa como interfase entre el lípido y la LC. ⁽³¹⁾⁽³²⁾ El SF se usó para conservar las LCs hasta el posterior análisis de proteínas, ya que es un elemento que permite mantener intactas las proteínas presentes en las LCs.

Una vez que la LC estaba guardada en el vial y etiquetada de la forma correcta, se almacenaron en el congelador a -30°C hasta su análisis; de esta forma se evitaba la evaporación del disolvente y hacía que la LC se mantuviera intacta hasta su posterior análisis. En el estudio de

Saville et al. las LCs se extrajeron con guantes estériles, las enjuagaron con solución salina y las almacenaron a -80°C. ⁽³¹⁾

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de cromatografía y espectroscopia del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza, para obtener la cantidad de lípidos y proteínas en las LCs usadas por una población universitaria.

En las LCs destinadas al análisis de lípidos se añadió agua MILLI Q con el objetivo de aislar los lípidos y el cloroformo:metanol del resto de la muestra; en el caso de las LCs destinadas al análisis de proteínas se añadió agua MILLI Q con ácido trifluoroacético y acetonitrilo, para extraer las proteínas de la LC. *L. Jones et al.* utilizó una mezcla similar para extraer las proteínas en las LCs usadas. ⁽¹³⁾

Tras la previa extracción de lípidos y proteínas, se usó un reactivo para obtener sustancias coloreadas. De esta forma se podía medir mediante la espectrofotometría UV-Visible. En el caso de los lípidos fue el reactivo fosfovainillina, *Hatou et al.* también usó este reactivo para formar complejos lípido-vainillina; ⁽³²⁾ para las proteínas se usó el reactivo de Bradford. Cuando la fosfovainillina reaccionaba con los lípidos formaba una disolución de color rosa que era capaz de absorber a una λ de 523 nm; en el caso del reactivo de Bradford al reaccionar con las proteínas tomaba un color azul capaz de absorber a una λ de 575 nm.

Como método para analizar la masa de lípidos y proteínas se utilizó la espectrofotometría UV-Visible, el cual registró los espectros en el rango de λ de 400 nm a 800 nm, ya que era en este rango donde se apreciaban los lípidos y proteínas. Este método fue usado por *Hatou et al.* en su estudio para conocer la cantidad de lípidos que se depositaron en diferentes materiales de HS. ⁽³²⁾ Además de la espectrofotometría UV-Visible existen otros métodos para detectar los depósitos en las LCs, como el HPLC que utilizó *Jones et al.* que permite identificar y cuantificar las diferentes clases de lípidos, la espectrometría de masas en tándem con HPLC de *Saville et al.*, o las sondas fotométricas realizado por *Mariarz et al.* ⁽³¹⁾⁽³²⁾ Se decidió usar la espectrofotometría UV-Visible debido a que se trata de un método relativamente sencillo, rápido y económico para medir los depósitos presentes en las LCs usadas, además de disponer de todos los elementos para su realización.

Para conocer la respuesta del detector frente a una concentración conocida, llamada muestra patrón, se realizó una curva de calibrado; que permitió conocer la masa de lípidos y proteínas de las LCs incluidas en este estudio. Con el ajuste lineal mediante mínimos cuadrados se pudo obtener la recta que mejor se ajustaba a una serie de puntos, en la que se representaba la absorbancia “y” frente a la masa “x”. A partir de la fórmula obtenida, del tipo $y = mx + b$, y el valor de la absorbancia se pudo conocer la masa de lípidos y proteínas presentes en cada LC.

Las concentraciones conocidas de lípidos se prepararon con oleato de metilo, ácido esteárico y colesterol; en el caso de las proteínas se utilizaron diferentes cantidades de BSA, *Ahmed et al.* también uso esta proteína. ⁽³⁴⁾

7.1. COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS

COMENTARIOS SOBRE LAS LENTES DE CONTACTO RECOGIDAS

De las 179 LCs recogidas, 143 LCs fueron incluidas en este estudio. Las LCs que se eliminaron presentaron algún problema en el laboratorio, fueron extraviadas o mal manipuladas por los

usuarios, es decir, no cumplieron con los criterios de inclusión o exclusión. De las LCs de usuarios controlados, no fueron incluidas todas debido a que en caso de haberlo hecho se habría falseado la muestra, incluyendo 5 LCs que habían estado en las mismas condiciones. Por ello, se eligió aleatoriamente el uso 5 para ser incluido en el estudio.

De las 143 LCs incluidas en el estudio, 86 LCs fueron guardadas en cloroformo:metanol y por tanto destinadas al análisis de los lípidos y 57 LCs fueron guardadas en SF y fueron destinadas al análisis de las proteínas.

El número de LCs destinadas al análisis de las proteínas fue menor que en las destinadas al estudio de los lípidos. Este fue un factor que condicionó en gran medida los resultados obtenidos, ya que en algunos casos no se presentaba la suficiente variedad como para mantener una relación fiable.

La mayoría de los donantes de LCs fueron mujeres, tanto en las LCs destinadas al análisis de lípidos como de proteínas. Este es un patrón que también se repitió en los estudios de *Hatou et al.* y *Saville et al.*, ya que más de la mitad de sus pacientes controlados fueron mujeres. ⁽³¹⁾⁽³²⁾

El rango de edad de los donantes en este estudio fue de 25 años, como la mayor parte eran miembros de la Universidad de Zaragoza se esperaba que la media de edad estuviera alrededor de ese valor. En otros estudios poblacionales, como el publicado por la *Gaceta (2018)*, concluyeron que la edad media de los usuarios de LCs era de 32-33 años. ⁽²⁶⁾

La LC predominante en este estudio fue del material HS, encontrando materiales como Comfilcon A, Fanfilcon A, y Nelfilcon A. *Saville et al.* usaron dos tipos de materiales, Balafilcon A y Senofilcon A en su estudio. *Hatou et al.* además de estos dos materiales también usaron Asmofilcon A; ambos grupos hicieron sus estudios con usuarios de tipo controlado, por tanto, la variedad que presentaron en cuanto al material fue definida por ellos mismos. ⁽³¹⁾⁽³²⁾

Como sistema de limpieza todos los donantes habían usado S.U. Habría sido interesante hacer comparaciones en función de los líquidos de mantenimiento, pero con las bases que se definieron en la metodología no se obtuvo esta variedad y por tanto no se pudo realizar esta comparación. Los pacientes controlados de los estudios de *Hatou et al.* y *Saville et al.* también usaron este tipo de sistema de limpieza. ⁽³¹⁾⁽³²⁾

Una gran parte de las LCs donadas fueron de reemplazo mensual, en el estudio poblacional de la *Gaceta (2018)* se concluyó que cada vez hay un mayor número de usuarios de LCs diarias, aunque el reemplazo más común sigue siendo el mensual. ⁽²⁶⁾ *Elden et al.* demostró que el aumento en el uso de las LCs de tipo mensual se debía a la mejora de los materiales con los que se fabrican las LCs. ⁽²⁸⁾

La mayoría de las LCs presentaban una geometría esférica, siendo el tipo de refracción más común la miopía. En el estudio poblacional citado anteriormente, también se llegó a la conclusión de que el tipo de geometría más común es el esférico, aunque hay un gran aumento de diseños cilíndricos. ⁽²⁶⁾ Sin embargo, según *Vázquez y Naranjo* el tipo de geometría más común es del tipo cilíndrico, siendo la refracción más frecuente el de tipo hipermetrópico compuesto. ⁽³⁵⁾ El predominio de LC esférica frente a la cilíndrica puede deberse a factores económicos, ya que muchos usuarios con astigmatismos bajos prefieren no añadirlo ya que el coste de la LC es mayor y porque no hay una gran mejora de la visión.

COMENTARIOS SOBRE LAS CANTIDADES DETECTADAS

Depósitos lipídicos

- **Según el material**

La cantidad de lípidos detectada en las LCs de HG fue mayor que en las de HS, sin demostrarse una relación directa entre ellas. Según *Hatou et al.* la deposición de lípidos es semejante en las LCs de HS que las de HG, siendo el colesterol el principal lípido presente; ⁽³²⁾ *Bontempo et al.* y *Rapp et al.* concluyeron que en las LCs hidrofílicas se depositan mayor cantidad de lípidos polares sobre su superficie. ⁽⁶⁾

Los resultados obtenidos no guardaron relación con los estudios mencionados; esto pudo deberse a que el número de LCs de HG fue mucho menor que el de tipo HS, provocando que no se pueda establecer una relación fiable entre estas dos variables, además de que algunas de las LCs estuvieron almacenadas un tiempo en S.U. lo que pudo interferir en la cantidad de lípidos.

- **Según el sexo**

La masa de lípidos fue mayor en las LCs correspondientes a las mujeres, sin existir una relación entre la cantidad de este depósito y el sexo. El resultado obtenido puede deberse a las hormonas sexuales, estrógenos o el uso de anticonceptivos, ya que estos factores podrían aumentar la cantidad de secreción lipídica en la lágrima, provocando una mayor cantidad de lípidos sobre la LC. ⁽²⁹⁾

- **Según el reemplazo**

La masa obtenida de lípidos fue muy semejante en las LCs mensuales y en las LCs diarias. En este estudio no se encontró relación significativa entre el tipo de reemplazo y cantidad de lípidos.

El resultado obtenido podría ser debido a que el número de LCs de reemplazo mensual es mayor que el diario, haciendo que no pueda existir una relación segura entre estos dos conceptos. También podría deberse a que los usuarios de uso no controlado no se les realizó ningún tipo de seguimiento, haciendo que les den un mal uso y como consecuencia provocando un aumento en la cantidad de lípidos.

- **Según la geometría**

La masa de lípidos fue mayor en las LCs esféricas que en las de geometría cilíndrica. Con este estudio se llegó a la conclusión de que no hay relación entre la adhesión de lípidos y el tipo de geometría. Podría existir algún tipo de relación entre el espesor de la LC y la cantidad de lípidos sobre su superficie, aunque actualmente no hay ningún estudio que corrobore o refute esta afirmación.

- **Según la edad, horas y días de uso**

Se estudió si la presencia y cantidad de lípidos pudo estar relacionada con la edad, las horas de uso y los días de uso de las LCs. Se concluyó que ninguna de estas variables mantenía una relación significativa.

En este estudio la falta de relación entre el tiempo de uso y la cantidad de lípidos en una LC pudo ser debida a que las LCs de uso no controlado no tuvieron un seguimiento durante su

uso, provocando una variación de toda la estadística. En cuanto a la cantidad de estos depósitos y la edad *Bennett et al.* demostraron que existe una alteración de la película lagrimal con la edad, induciendo una disminución de la capa lipídica y mayor evaporación de la lágrima que podría afectar a los lípidos depositados sobre la LC. ⁽³⁶⁾

Depósitos proteicos

- **Según el material**

La masa de proteínas fue mayor en las LCs de HG que en las de HS, pero no se estableció ninguna relación entre el material y dicha cantidad. *Zhao et al.* concluyeron que el polímero que compone la LC es un factor que determina la cantidad de proteínas presentes las LCs. ⁽⁶⁾; mientras que *D. Luensman et al.* y *L. Jones et al.* en sus estudios, llegaron a la conclusión de que la cantidad de proteínas es más alta cuando se trata de un material iónico, ya que la carga negativa favorece a la deposición de proteínas. ⁽¹³⁾

Los resultados obtenidos en este estudio no son fiables, debido a que solo se disponían de 2 LCs del tipo HG. Habría sido interesante realizar esta comparación con el mismo número de LCs de HS e HG.

- **Según el sexo**

La cantidad de proteínas fue mayor en las LCs correspondientes a las mujeres, sin existir una relación entre la cantidad de depósitos y el sexo. *Hatou et al.* realizaron su estudio a mujeres y hombres, pero en los resultados no realizaron una distinción según el sexo. ⁽³²⁾

- **Según el reemplazo**

La masa obtenida de proteínas fue mayor en las LCs mensuales que en las LCs diarias, sin existir relación entre estos factores. Según *Jones et al.* las LCs absorben rápidamente las proteínas presentes en la película lagrimal, ⁽³⁷⁾ por lo que se puede llegar a la conclusión de que a cuanto más tiempo se usen mayor cantidad de proteínas hay en la LC. En este estudio no se apreció el mismo resultado, esto pudo ser debido a que todas las LCs antes de ser recogidas estuvieron guardadas en S.U. lo que provocó que disminuyera la cantidad de proteínas.

- **Según la geometría**

La masa de proteínas fue mayor en las LCs esféricas que en las cilíndricas, sin existir relación entre la adhesión de proteínas y el tipo de geometría. En este caso número de LCs cilíndricas fue menor que el de tipo esférico, provocando que no se pueda establecer una relación fiable.

- **Según la edad, horas y días de uso**

En este estudio se concluyó que la cantidad y presencia de proteínas sobre una LC no guarda ningún tipo de relación con la edad, las horas de uso ni días de uso.

Jones et al. observaron que hay una mayor cantidad de proteínas en las LCs a medida que se aumentan las horas de uso, aunque esto podría variar dependiendo de las características de la LC y el sujeto que las porta. ⁽³⁷⁾ Los resultados obtenidos no coincidieron con lo esperado; pudo ser debido las LCs estuvieron guardadas en S.U. antes de ser recogidas lo que provocó una eliminación de gran parte de las proteínas, la ausencia de un seguimiento de las LCs de uso no controlado o una mala recogida de datos a los donantes.

8. CONCLUSIONES

- Primera

La espectrofotometría UV-Visual es una técnica que permite detectar y cuantificar la cantidad de lípidos y proteínas presentes en las LCs.

- Segunda

La cantidad de lípidos y proteínas en las LCs incluidas en este estudio, detectados mediante la espectrofotometría UV-Visible, no presenta una relación directa con las horas de uso ni los días de uso, sin coincidir con otros estudios realizados.

- Tercera

La cantidad de depósitos lipídicos y proteicos de la muestra estudiada, detectados mediante la espectrofotometría UV-Visible, no guardó ninguna relación en función del tipo de material, geometría y el sexo, siendo estos resultados diferentes a los realizados en otros estudios.

- Cuarta

La mayoría de los colaboradores en este estudio fueron mujeres, por lo que se podría concluir que este género es el más afín al uso de LCs.

- Quinta

Una gran parte de las LCs estudiadas compensaban el defecto refractivo de la miopía, seguido de la combinación de miopía e hipermetropía, lo que corresponde con la mayor tasa de miopes frente a hipermétropes.

- Sexta

La mayor parte de las LCs incluidas en este estudio fueron de reemplazo mensual y de material HS, tal y como se recoge en otros estudios sobre tendencias de usos de LCs.

9. ABREVIATURAS

Absorbancia: A.

Albúmina extraída del plasma bovino, proteína: BSA.

American Optometric Association: AOA.

Cromatografía de capa fina: CCF.

Centímetros: cm.

Cromatografía de gases: CG.

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento: HPLC.

Food and Drug Administration: FDA.

Hidrogel: HG.

Hidrogel silicona: HS.

Inmunoglobulina A: IgA.

Lente de contacto: LC.

Lentes de contacto: LCs.

Lente de contacto blanda: LCB.

Lente de contacto permeable a los gases: LCRGP.

Longitud de onda: λ .

Microlitros: μL .

Miligramos: mg.

Milímetros: mm.

Nanómetros: nm.

Parámetro de significancia en el análisis de Pearson: p.

Suero fisiológico: SF.

Solución única: S.U.

Transmitancia: T.

Ultravioleta: UV.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. López Alemany, Dr A. *Lentes de contacto: materiales y aspectos clínicos*. Valencia: Ulleye, 1997. p. 126.
2. Gorrochotegui, MA; Rojas, MC; Serrano, H; Gorrochotegui, MC. "*Lentes de Contacto: Historia, Tipos y Complicaciones de su Uso*". Informe médico. 2009. 11(2). 79-101.
3. Velázquez Guerrero, R. "*Materiales de lentes de contacto y sus propiedades*". Imagen óptica. [En línea], [Consulta: Enero de 2019]. Disponible en: <http://www.imagenoptica.com.mx/pdf/revista50/materiales.htm>.
4. Musgrave, CSA; Fang, F. "*Contact Lens Materials: A Materials Science Perspective*". Materials, 2019; 12(2), 1-25.
5. López Alemany, Dr A. *Lentes de contacto: teoría y práctica*. Valencia : Ulleye, 2008. p. 36-184.
6. Rivera, L; Delgado, JL. "*Película lagrimal: su interacción y su adherencia sobre los lentes de contacto de hidrogel de silicona*". Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular, 2011; 9(1), 103-114.
7. M. McDermott, A. "*Antimicrobial Compounds in Tears*". Exp Eye Res, 2013; 117, 53-61.
8. Omali, NB; Zhao, Z; Zhu, H; Tilia, D; Willcox, M D.P. "*Quantification of individual proteins in silicone hydrogel contact lens deposits*". Molecular Vision, 2013; 19, 390-333
9. Bloise, L. "*Surveillance, hygiène et entretien des lentilles de contact*". Journal français d'ophtalmologie, 2017; 29, 329-337.
10. Nichols, JJ. "*Deposition on Silicone Hydrogel Lenses*". Eye & Contact Lens, 2013; 39(1), 20-23.
11. Lorentz, H; Jones, L. "*Lipid Deposition on Hydrogel Contact Lenses: How History Can Help Us Today*". Optometry and vision science, 2007; 84(4), 286-295.
12. Mc Glibery, RW. *Conceptos bioquímicos*. : Reverté. 1977.
13. Luensmann, D; Jones, L. "*Protein deposition on contact lenses: the past, the present, and the future*". Contact Lens & Anterior Eye, 2012; 35, 53-64.
14. Castiblanco, D; Fabiola Rodríguez, M; Mayorga C, MT. "*Bacilos gram negativos, contaminantes mas prevalentes en lentes de contacto blandos usados*". Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular, 2007; 9, 57-66.
15. A. Skoog, D; M. West, D; Holler, J. *Fundamentos de química analítica*. Reverté, 2001. p. 517-724.
16. Barquero Quirós, M. *Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño*. UCR: Serie Química, 2004. p. IX.
17. C. Harris, D. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté, 2007. p. 579-608.
18. Freifelder, D. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté, 200. p. 195-198.
19. Guarnizo Franco, A; Martínez Yepes, PN. *Experimentos de química orgánica, con enfoque en ciencias de la vida*. Elizcom, 2009. p. 101-103.
20. Walton F., H; Reyes, J. *Análisis químico e instrumental moderno*. Reverté, 2005. p. 323-326.
21. Baquero Quirós, M. *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. UCR: Serie Química 2006. p. 1-2.
22. Harris, DC. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté, 2001. p. 499-505.
23. Silva García, MC; García Bermejo, MJ; del Castillo Torres, L; Ania Palacio, JM; Gómez Martínez, D. *Técnico especialista en laboratorio*. Mad, 2006. p. 234.

24. Hernández Hernández, L; González Pérez, C. *Introducción al análisis instrumental*. Ariel, 2002. p. 45-47.
25. Pino Perez, F; Perez Bendito, D. *Análisis de elementos-traza por Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta-visible*. 1983. p. 123.
26. Santodomingo, Dr. J; Villa, Dr. C; Morgan, Dr. P. "*Lentes de contacto adaptadas en España en 2017: comparación con otros países*". *Gaceta*. 2018, 533.
27. Qiurong, Z; Yang, B; Deng, N; Li, Y; Wang, T; Qi, H; Liu, L. "*The use of contact lenses among university students in Chengdu: Knowledge and practice of contact lens wearers*". *Contact Lens and Anterior Eye*, 2018; 41(2), 229-233.
28. Garza León, M; de Fátima Arroyo, L; Ibañez García, M; Villarreal Calderón, JR; Hernández Morales, X; Chapa de la Peña, A; Cárdenas Rodríguez, II; Díaz Gómez, MC. "*Patrón de uso de lentes de contacto y sintomatología asociada en estudiantes universitarios*". *Revista Mexicana de Oftalmología*, 2016; 91(1), 9-17.
29. Jiménez Caro, A; Jiménez Forero, C. "*Cambios en la película lagrimal con el uso simultáneo de lentes de contacto y tratamientos anticonceptivos hormonales*". *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*, 2017; 15(1), 79-89.
30. Morales Mac-Hale, C. "*Cumplimiento en lentes de contacto en Latinoamérica: un desafío educativo, no cultural*". *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*, 2015; 13(2):113-125
31. T. Saville, J; Zaho, Z; D. P. Willcox, M; J. Blanksby, S; W. Mitchell, T. "*Detection and Quantification of Tear Phospholipids and Cholesterol in Contact Lens Deposits: The Effect of Contact Lens Material and Lens Care Solution*". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010; 51 (6). 2843-2851.
32. Hatou, S; Fukui, M; Yatsui, K; Michizuki, H; Akune, Y; Yamada, M. "*Biochemical analyses of lipids deposited on silicone hydrogel lenses*". *Journal of Optometry*, 2010; 3(3), 164-168.
33. Lorenz, H; Heyen, M; M.M. Kay, L; Yvette Dominici, C; Khan, W; W.S. Ng, W; Jones, L. "*Contact lens physical properties and lipid deposition in a novel characterized artificial tear solution*". *Molecular Vision*, 2011; 17, 3392-3405.
34. Abdelkawi Ahmed, S; Mohi Eldin, I; Fouad Ghoneim, D; Mohamed Safwat, AE. "*Effect of intense pulsed light therapy on tear proteins and lipids in meibomian gland dysfunction*". *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, 2019; 14(1), 3-10.
35. Muñoz Lazo, A; Sánchez Hernández, A. "*Resultados visuales en pacientes portadores de lentes de contacto por ametropías en Pinar del Río*". *Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 2017; 21(1), 41-46.
36. Mayorga C, MT. "*Estabilidad de la película lagrimal precorneal*". *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*, 2009; 7(2), 141-156.
37. Jones, L; Senchyna, M; Glasier, MA; Schickler, J; Forbes, Iain; Louie, D; May, C. "*Lysozyme and Lipid Deposition on Silicone Hydrogel Contact Lens Materials*". *Eye & Contact Lens*, 2003; 29(15), 575-579.

Figura 1. Abril Díaz, N; Bárcena Ruiz, JA; Fernández Reyes, E; Galván Cejudo, A; Jorrín Novo, J; Peinado Peinado, J; Toribio Meléndez-Valdés, F; Túnez Fiñana, I. "*Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*". Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

11. ANEXOS

ANEXO 1. INFORMACIÓN PARA VOLUNTARIOS DE USO CONTROLADO

En este documento encontrará toda la información para participar en este estudio. Si tiene cualquier pregunta no dude en ponerse en contacto con su optometrista del estudio:

Diana Martínez: dianamartinezarmengot@gmail.com

Teléfono de contacto: 606461661

A continuación, tiene un resumen de las pautas de uso que debe seguir con sus LCs.

1. Utilizar la LC 1 día y al extraer colocarlas en el vial que tiene el código N° 1. La LC del ojo derecho en el que indica "OD" y la del izquierdo en el "OI"
2. Utilizar 7 días las LC: conservarlas en el líquido de mantenimiento una vez las extraiga del ojo. Al séptimo día guardarlas directamente en los viales con código N° 2, cada ojo en el vial como se ha indicado en el apartado 1º.
3. Utilizar 7 días las LC: al extraerlas del ojo, deben frotar un poco la superficie de la LC después de haber depositado una gota de la solución única, posteriormente introdúzcala en su porta lentes con líquido de mantenimiento, repetir esto cada día. Al 7º día, al quitarse las LCs sin hacer ninguna intervención, deben colocarse en los viales N° 3.
4. Utilizar 15 días las LC. Al extraerlas del ojo, introducirlas en el porta lentes y conservarlas en la solución única, sin hacer ningún tipo de tratamiento especial. Tras el 15º día, colocarlas directamente en los viales N° 4 respectivamente.
5. Utilizar 15 días las LC. Al extraerlas del ojo, deben frotarlas igual que el paso 3 y después introducirlas en su porta lentes con solución única, repetir esto cada día. Al 15º día, al extraer las LCs, introdúzcalas directamente en los respectivos viales N° 5.

Si durante el uso de alguna de las LCs tiene cualquier sensación de molestia, la pierde o la rompe, o cree que pueda estar desarrollando un proceso alérgico o de conjuntivitis, póngase en contacto con su optometrista.

Como usuario de LCs, conocerá ciertas recomendaciones que debe seguir durante el uso. A continuación, expondremos un breve resumen de ellas:

- Lávese las manos con jabón, enjuáguelas y séquelas al viento o con una toalla que no suelte restos de tejido o de pelusas antes de manipular las LCs.
- Nunca utilice las LCs más días de los indicados en el protocolo del estudio.
- Vacíe por completo y llene diariamente el estuche de las LCs con la solución única.
- Evite el contacto directo de las LCs con objetos no esterilizados.
- Evite ducharse con las LCs puestas y nunca las enjuague con agua del grifo ni con saliva, el agua corriente contiene muchos microorganismos que pueden provocar graves infecciones.
- Nunca duerma con las LCs puestas, con los párpados cerrados el aporte de oxígeno y lágrima disminuye drásticamente.
- Inserte y coloque las LCs antes de utilizar maquillaje, y, al final del día, retire primero las LCs y después el maquillaje.

¿NOS DONAS TUS LENTILLAS USADAS?

Si eres estudiante,

¡TE NECESITAMOS!

(Nos valen todo tipo de lentillas usadas, mensual, diaria, trimestral...)

Recogemos lentillas el 19 de diciembre a las 11 a.m.
En el Hall de la Facultad de Ciencias

**Con esto contribuyes a
nuestro estudio para el TFG.**



**¡ADEMÁS ENTRARÁS EN EL MAGNÍFICO
SORTEO DE UNAS GAFAS DE SOL!**

ANEXO 3. CUESTIONARIO SOBRE EL USO DE LAS LENTES DE CONTACTO

Cuestionario anónimo. Gracias por participar en nuestro estudio, y gracias por perder unos minutos en rellenar estas sencillas preguntas. Si eres donante sin control de uso, por favor, rellena todas las preguntas. ¡¡Gracias de nuevo!! Sobre las lentillas que nos vas a dar:

1. ¿Qué marca de LC utilizas? Si no tiene o sabes el nombre comercial dinos la óptica en la que la compras y algún dato más sobre el pack (precio, nº de LC, lo que pone en la caja, etc.):
2. Estas lentillas, ¿son de desecho mensual o diario?
3. ¿Cuántos días has usado estas LCs antes de donarlas?
4. ¿Cuántas horas crees que las has estado utilizando al día? (aprox.)
5. ¿Cómo se llama el sistema de mantenimiento que utilizas? Si no tiene nombre, danos información igual que has hecho con la marca de lentilla.
6. Si te habías enterado de que recogíamos LCs, y la has guardado para nosotros durante unos días, ¿cuántos días hace que las metiste en el bote?
7. Sobre los días de uso: ¿has tenido algún síntoma de alergia, conjuntivitis o algo similar? ¿Y en los últimos 3 meses?

Algunas preguntas sobre el uso habitual que le das a tus LCs:

1. ¿Las usas muchas horas? ¿Cuántas?
2. Aunque tu pack sea de desecho mensual ¿Cuánto tiempo te dura una LC? Un mes, más, o menos.
3. ¿Las sientes igual de cómodas a lo largo del día?
4. ¿Usas alguna lágrima artificial para ir más cómodo?
5. ¿Las sientes igual de cómodas a lo largo de todo el mes de uso? ¿La visión que te dan es buena todo el día?
6. ¿La visión que te dan es buena todo el mes?
7. ¿Se te pone el ojo rojo? o notas molestias?? Cuáles
8. ¿te han dicho alguna vez, tu oftalmólogo u optometrista, si tienes ojo seco?
9. Más o menos, sobre tu dieta (alimentaria): Marca las que creas
 - (a) Basada en hidratos: pasta, arroz, pan, etc.
 - (b) Basada en hidratos: verdura, fruta, etc.
 - (c) Basada en proteína: carne, huevos, etc.
 - (d) Basada en proteína: pescados, huevos, etc.
 - (e) Basada en grasas sanas: algún aguacate, quesos, leche, carnes grasas, etc.
 - (f) Basada en grasas no tan sanas: hamburguesas, pizzas, reposterías, etc.
 - (g) Bebo alcohol todos los días: 1 cerveza o 1 vino.
 - (h) Bebo alcohol los fines de semana: porque salgo de marcha.

ANEXO 4. MATERIAL DE LABORATORIO

- **Acetona, escobillas y agua destilada.** Para limpiar los utensilios que se usan.
- **Agitador de vórtex.** Instrumento que mezcla o remueve el contenido de pequeños viales.
- **Balanza analítica.** Instrumento para medir cantidades pequeñas.
- **Calefactor.** Usado para calentar muestras de cristal.
- **Cubetas de cuarzo.** Pequeños recipientes de cuarzo, con dos caras opacas y las otras dos transparentes, donde se colocan la muestra que se desea analizar y la de referencia.
- **Desecador termostático al vacío “Vacuo Temp” SELECTA.** Usado para evaporar el líquido de cada muestra.
- **Espectrofotómetro UV-VIS V-670 Jasco.** Espectrofotómetro de doble haz que permite la medición de muestras en un rango de λ de 190 nm a 2500 nm.
- **Gradilla.** Usada para sostener y almacenar los tubos Eppendorf.
- **Jeringuilla.** Usada para añadir o extraer pequeñas cantidades de una muestra.
- **Matraz.** Recipiente esférico de vidrio.
- **Matraz aforado.** Utensilio de vidrio con un cuello estrecho, alargado y con una línea de aforo, se utiliza para preparar disoluciones en un volumen conocido.
- **Micropipetas de 50 μ L, 100 μ L y 200 μ L.** Usadas para trasladar pequeñas cantidades de volumen.
- **Ordenador.** Registrar los resultados obtenidos por el espectrofotómetro.
- **Puntas desechables.** Puntas que se colocan en la micropipeta y se desechan una vez utilizadas para que no haya contaminación entre una muestra y otra.
- **Pinzas.** Objeto con dos pequeñas puntas de metal, utilizado para extraer las LCs de los viales
- **Pipeta graduada.** Para medir una determinada cantidad de volumen con precisión.
- **Pipetador.** Permite medir líquido con mucha precisión.
- **Tubos Eppendorf.** Viales de plástico usados para guardar las LCs.
- **Vórtex.** Usado para mezclar componentes.

ANEXO 5. REACTIVOS USADOS EN EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS

- **Cloroformo** (calidad HPLC, Scharlab).
- **Metanol** (Calidad HPLC, Scharlab).
- **Agua ultra pura "MILLI Q"**.
- **Ácido sulfúrico** (96% de concentración, Scharlab).
- **Vainillina** 60 mg (Sigma- Aldrich).
- **Ácido fosfórico** (85% de concentración, grado HPLC, Scharlab).
- **Ácidos grasos**. Ácido esteárico, oleato de metilo y colesterol (Sigma- Aldrich).
- **Pentaóxido de fosforo** (Scharlab S.L., Barcelona (España)).
- **Ácido trifluoroacético** (calidad HPLC de Scharlab (Valencia).
- **Acetonitrilo** (calidad HPLC Scharlab S.L., Barcelona (España)).
- **Reactivo de Bradford**.
- **Patrón BSA** (Albumina del plasma bovino) 100 µL/ml en H₂O preparado en el laboratorio.
Se disolvió la BSA (96%) en Suero salino (Fresenius kabi, España).

ANEXO 6. PREPARACIÓN DEL REACTIVO FOSFOVAINILLINA Y BRADFORD

Reactivo fosfovainillina

Con la balanza analítica se pesaron 60 mg de vainillina, y esta se mezcló con 10 ml de agua MILLI Q. Esta mezcla se puso en un matraz, y se calentó en un baño de agua a 60°, para que la vainillina se disolviera y se mezclara bien con el agua, agitándola manualmente hasta que la vainillina estuviera totalmente disuelta.

Con una pipeta graduada se extrajeron 5 ml de esta disolución para colocarla en un matraz aforado de 25 ml, a lo que se le añadió ácido fosfórico (85% p/v) hasta alcanzar esta medida.

El reactivo fosfovainillina permite averiguar la cantidad de lípidos presentes en la LC, ya que este reactivo reacciona con los lípidos, formando sustancias coloreadas lo que permite su medida mediante la espectrofotometría UV-Visible.

Reactivo de Bradford diluido

Para preparar el reactivo de Bradford se disolvieron 5 mg de azul Comassie en 2,5 ml de etanol al 96% de concentración. A esto se le añadió 5 ml de ácido ortofosfórico al 85%, y se diluyó hasta 50 ml con agua destilada. Se dejó reposar durante 24 horas en la oscuridad y se filtró dos veces con papel de filtro.

Para preparar el reactivo de Bradford diluido, en un matraz aforado, 1 ml del reactivo de Bradford, preparado anteriormente, fue llevado a 5 ml con agua MILLI Q en un matraz aforado.

Este reactivo reaccionó con las proteínas para formar sustancias coloreadas; de esta forma se podía determinar la cantidad de proteínas presentes en las LCs mediante la espectrofotometría UV-Visible.

ANEXO 7. CURVAS DE CALIBRADO

Curva de calibrado para los lípidos

Para obtener una muestra patrón con una concentración de lípidos conocida, se mezclaron 5 mg de ácido oleico (oleato de metilo), 2,5 mg de ácido esteárico, 1,5 mg de colesterol y 10 ml de cloroformo. De esta mezcla se pusieron distintos volúmenes de la disolución inicial en diferentes viales, para tener muestras con distinta cantidad de lípidos. Se eliminó el cloroformo por evaporación en la desecadora termostática, y se siguió el protocolo de preparación de las muestras descrito.

La masa de las muestras patrón fue: 1 mg, 0,5 mg, 0,25 mg, 0,1 mg y 0,05 mg.

Todas estas muestras se procesaron siguiendo la metodología descrita previamente y se midió su absorbancia a la λ de 523nm.

A partir de los valores de la absorbancia y con el ajuste de la recta se obtuvo la siguiente fórmula: **$y = 3,2427x + 0,4197$, $R^2 = 0,999$** ; esta relacionó la cantidad de cada muestra con la absorbancia de cada una.

Siendo “y” la absorbancia en la λ de 523 nm y “x” la masa de lípidos (mg).

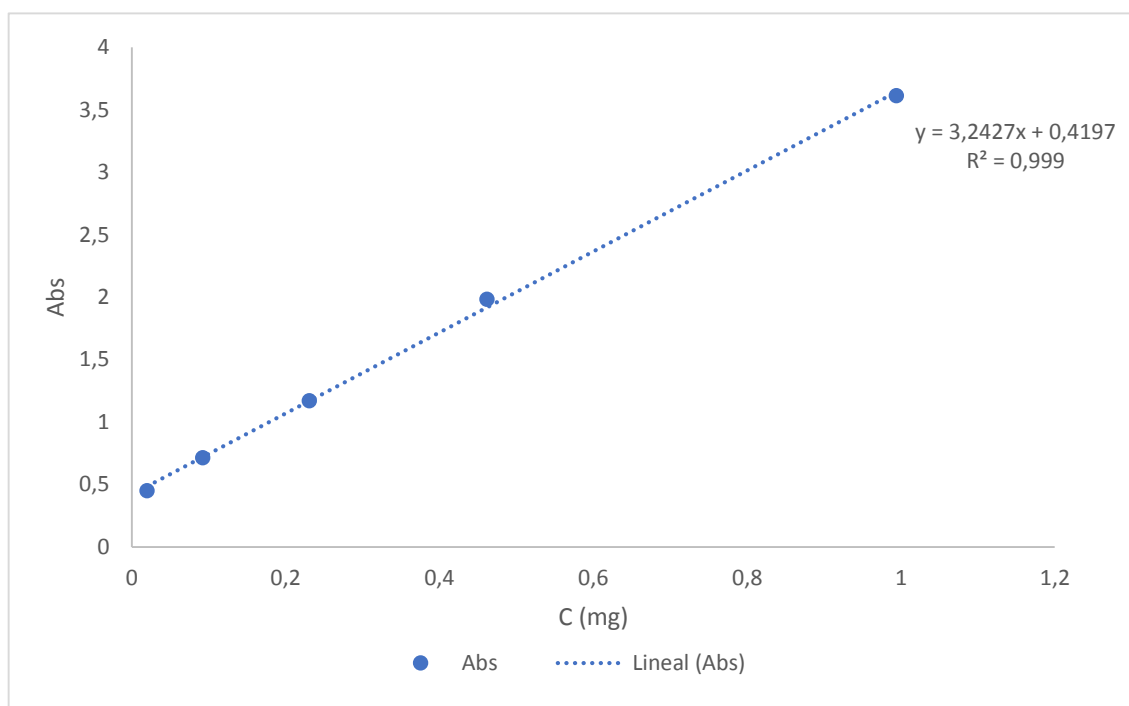


Figura 3. Representación lineal de la curva de calibrado de las muestras de lípidos.

Curva de calibrado para las proteínas

Para obtener la recta de calibrado correspondiente a las proteínas, se prepararon cantidades conocidas de proteínas a partir de 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en agua MILLI Q. De esta mezcla se pusieron distintos volúmenes en diferentes viales, para tener muestras con distinta cantidad de proteínas. Se eliminó el agua por evaporación en la desecadora termostática, y se siguió el protocolo de preparación de las muestras descrito. De esta disolución se tomaron 50 µL y se mezclaron con 1 ml de reactivo de Bradford.

Las cantidades de las muestras patrón fueron: 0,1 mg, 0,15 mg, 0,025 mg, 0,05 mg y 0,075 mg.

Todas las muestras se procesaron siguiendo la metodología descrita anteriormente y se midió su absorbancia a la λ de 575 nm.

A partir de los valores de absorbancia y cantidad, se consiguió la fórmula que relacionaba la concentración de cada muestra con la absorbancia: $y = 0.868x - 0.0007$, $R^2 = 0,9993$.

Siendo “y” la absorbancia en la λ de 575 nm y “x” la masa de proteínas (mg).

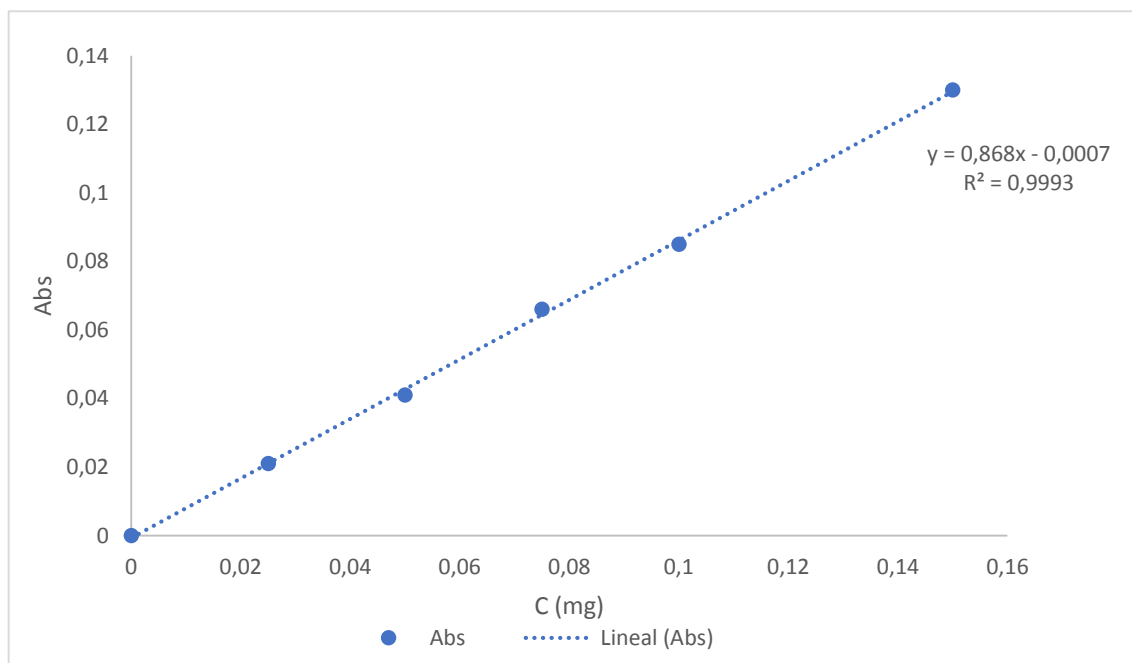


Figura 4. Representación lineal de la curva de calibrado de las muestras de proteínas.

ANEXO 8. SOLUCIONES ÚNICAS

S.U.	AGENTE SUFRACTANTE	AGENTE HUMECTANTE	AGENTE CONSERVANTE
AVIZOR	Poloxamer	Polivinilpirrolidona	Polihexanida
BIOTRUE	Poloxamina	Ácido hialurónico	Poliaminopropil biguanida
DISOP	Poloxamer	Polihexametilen biguanida	- Polihexanida - Polihexametilen biguanida
ACOFARMA	Poloxamer	hidroxipropilmetil celulosa	Polihexametilen biguanida

Tabla 2. Composición de algunas S.U. incluidas en este estudio.

ANEXO 9. MASA DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS

		MASA DE LÍPIDOS (mg/LC)	p	MASA DE PROTEÍNAS (mg/LC)	P
MATERIAL	<i>HS</i>	0,229	0,232	0,091	0,102
	<i>HG</i>	0,299		0,309	
SEXO	<i>Mujer</i>	0,250	0,390	0,106	0,209
	<i>Hombre</i>	0,202		0,052	
REEMPLAZO	<i>Mensual</i>	0,237	0,843	0,0920	0,243
	<i>Diaria</i>	0,247		0,1301	
GEOMETRÍA	<i>Esférica</i>	0,262	0,378	0,107	0,058
	<i>Cilíndrica</i>	0,192		0,0436	

Tabla 3. Masa de lípidos y proteínas según el material, sexo, reemplazo y geometría de la LC; valores de la significancia ($p < 0,05$).